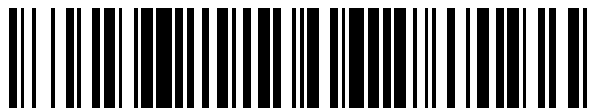


19

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 458 465**

21 Número de solicitud: 201231516

51 Int. Cl.:

**C12P 39/00** (2006.01)**C12P 7/18** (2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**01.10.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**05.05.2014**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070674**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTIFICAS (CSIC) (75.0%)****Serrano nº 117****28006 MADRID ES y****YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY  
OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM,  
LTD. (25.0%)**

72 Inventor/es:

**MARTINEZ LOPEZ, Virginia;****PRIETO JIMENEZ, Maria Auxiliadora;****GARCIA LOPEZ, Jose Luis y****JURKEVITCH, Edouard**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**54 Título: **PROCEDIMIENTO DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE  
POLIHIDROXIALCANOATOS Y DERIVADOS QUE COMPRENDE LA UTILIZACION DE  
PREDADORES BACTERIANOS**

57 Resumen:

Procedimiento de fermentación para la producción de polihidroxialcanoatos y derivados que comprende la utilización de predadores bacterianos.

Procedimiento de extracción de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en polihidroxialcanoato (PHA), hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, y obtenido por fermentación de una bacteria productora presa, caracterizado dicho procedimiento de extracción porque comprende mezclar la bacteria productora presa que contiene el bioproducto en su interior con una bacteria depredadora en un medio que comprende una fuente de Ca y Mg. Preferiblemente la bacteria depredadora *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 y la bacteria productora presa es *Pseudomonas putida* KT2440 o *Cupriavidus necator* H16. Adicionalmente, también se describe un método de obtención del bioproducto que comprende la extracción por el procedimiento de la invención.

ES 2 458 465 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de fermentación para la producción de polihidroxicanoatos y derivados que comprende la utilización de predadores bacterianos

## SECTOR DE LA TÉCNICA

Uno de los objetos de la presente invención es un procedimiento de producción de polihidroxicanoatos y derivados por fermentación bacteriana en el que se facilita la extracción del producto mediante la lisis de la bacteria productora con una bacteria predadora, y por tanto, se incluye en el área de la Biotecnología Industrial en el sector de la Industria Química, y en particular de la denominada Química Sostenible o Química Verde, pudiendo afectar tanto al subsector de las sustancias químicas primarias como al subsector de las sustancias químicas especializadas.

## ESTADO DE LA TÉCNICA

La biotecnología de los bioprocesos industriales está experimentando en los últimos años avances considerables para mejorar y adaptar las modernas técnicas de la biología molecular y de la microbiología a las tecnologías clásicas de fermentación. En este sentido, la tecnología del DNA recombinante o, en un concepto más amplio, las técnicas de biología molecular, han sido determinantes para que podamos explotar y manipular un gran número de organismos para la producción de sustancias de interés. En gran medida, este éxito ha sido posible gracias al desarrollo de sistemas para expresión de genes en organismos heterólogos más fáciles de manipular y multiplicar. Dentro de las diferentes opciones que se pueden estudiar, cabe destacar aquellas que no sólo pretenden la expresión de un gen o conjunto de genes sino que, además, tratan de facilitar la obtención de un producto de interés biotecnológico y de alto valor añadido, como son los bioplásticos. Sin embargo, el uso de este tipo de biopolímeros no se ha implantado hasta ahora en el mercado de forma competitiva debido al bajo coste que aún mantiene la síntesis de los polímeros plásticos derivados del petróleo (Prieto *et al.* 2007. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates. In *Pseudomonas: a Model System in Biology*. *Pseudomonas*, vol. V, Eds, Ramos, J. L. y Filloux, A. Springer, 397–428).

Actualmente, como consecuencia del problema de contaminación medioambiental que ha generado el uso del plástico convencional y el incremento del precio del petróleo, se está haciendo una apuesta clara por la implantación de procesos de tipo sostenible para la obtención de energía y la producción de materiales de alto consumo como son los polímeros plásticos.

Los polihidroxicanoatos, conocidos comúnmente como “bioplásticos”, son polímeros biodegradables producidos por ciertas bacterias, que se acumulan en el interior celular en forma de gránulos de reserva de fuente de carbono cuando las condiciones de cultivo no son óptimas para el crecimiento (Prieto *et al.* 2007. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates. In *Pseudomonas: a Model System in Biology*. *Pseudomonas*, vol. V, Eds, Ramos, J. L. y Filloux, A. Springer, 397–428).

Estos biopolímeros biodegradables son sintetizados por bacterias a partir de fuentes renovables como la glucosa, la fructosa o los ácidos grasos que forman parte de los aceites vegetales (Prieto *et al.* 2007. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates. In *Pseudomonas: a Model System in Biology*. *Pseudomonas*, vol. V, Eds, Ramos, J. L. y Filloux, A. Springer, 397–428). Por tanto, se puede definir el término bioplástico como biopolímero sintetizado a partir de fuentes renovables, que puede ser degradado en condiciones controladas de biodegradación y que presenta características físico-químicas similares a los plásticos derivados de la industria petroquímica (Sarasa *et al.* 2009. *Bioresour. Technol.* 100: 3764–3768).

En general, los gránulos de PHA están compuestos por un poliéster que comprende 93-97% del peso seco del gránulo (PSG), rodeado por entre 1-6 % del PSG de fosfolípidos y entre 1-2 % del PSG de proteínas asociadas al gránulo (denominadas GAPs según sus siglas en inglés), las cuales forman una fina capa en la superficie del gránulo (Steinbüchel *et al.* 1995. *Can. J. Microbiol.* 41: 94–105).

Los PHAs se clasifican en dos tipos principales de acuerdo a su estructura química: los PHAs de cadena corta (scl-PHAs) obtenidos a partir de monómeros con 4 o 5 átomos de carbono y los de cadena media (mcl-PHAs) procedentes de monómeros con 6 a 14 átomos de carbono. Los diferentes PHAs identificados hasta la fecha son polímeros lineales compuestos de 3-hidroxiácidos grasos exclusivamente de la configuración *R*. El peso molecular de estos polímeros puede variar entre 50.000-1.000.000 y su diversidad radica en las sustituciones en el carbono asimétrico en posición 3, que le confiere al polímero el carácter quiral. Estos polímeros, biopoliésteres, están formados únicamente por la forma enantiomérica *R* de los hidroxicanoatos (RHA) (Prieto *et al.* 1999. *J. Bacteriol.* 181: 858–868; Chen *et al.* 2005. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:592–599; Ren *et al.* 2010. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:41–52).

El scl-PHA más abundante en bacterias y más estudiado hasta la fecha es el poli-(3-hidroxibutirato) (PHB), cuya ruta específica de síntesis ha sido ampliamente investigada en la cepa bacteriana *Ralstonia eutropha* H16, recientemente reclasificada como *Cupriavidus necator* H16 (Poehlein *et al.* 2011. *J. Bacteriol.* 193: 5017). Este polímero se sintetiza a partir de acetil-CoA en una serie de tres reacciones consecutivas. En primer lugar se acoplan dos moléculas de

acetil-CoA, generando acetoacetil-CoA en una reacción de condensación catalizada por una  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa (PhbA). A continuación, el acetoacetil-CoA generado es reducido estereoselectivamente dando (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA en una reacción catalizada por la acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH (PhbB). Finalmente, los monómeros de (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA son polimerizados por la acción de una polimerasa de PHB (PhbC) (Peoples y Sinskey, 1989. *J. Biol. Chem.* 264: 15298-15303).

Los mcl-PHA producidos por el género *Pseudomonas* están compuestos mayoritariamente por monómeros de ácido hidroxi octanoico, pero también se pueden encontrar en menor porcentaje una gran diversidad de monómeros que contienen como sustituyentes grupos aromáticos, alifáticos, insaturados, saturados, con ramificaciones, etc. (García *et al.* 1999. *J. Biol. Chem.* 274: 29228-29241). Esto es debido principalmente a la gran diversidad metabólica que caracteriza a estos microorganismos ya que pueden transformar una gran variedad de sustratos en intermediarios 3-hidroxialcanoicos mediante la ruta de  $\beta$ -oxidación y de síntesis *de novo* de ácidos grasos (Prieto *et al.* 2007. *Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates*. In *Pseudomonas: a Model System in Biology*. *Pseudomonas*, vol. V, Eds, Ramos, J. L. y Filloux, A. Springer. 397-428).

Se sabe que la composición del PHA depende de la fuente de carbono presente en el medio de cultivo utilizado durante la fermentación de la bacteria productora (Durner *et al.* 2001. *Biotechnol. Bioeng.* 72: 278-288; Jung *et al.* 2001. *Biotechnol. Bioeng.* 72:19-24). Por otra parte, es importante resaltar que las características físico-químicas de estos polímeros varían según la naturaleza química de los monómeros que los componen (Madison y Huisman, 1999. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 21-53). Teniendo en cuenta que se han descrito más de 140 RHAs diferentes en PHAs producidos por bacterias (Steinbüchel *et al.* 1995. *Can. J. Microbiol.* 41: 94-105), y que el biopolímero después de su obtención por fermentación puede ser sometido a posteriores modificaciones químicas, como a su entrecruzamiento y a la adición de grupos funcionales (Hazer *et al.*, 2007. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 1-12), es fácil imaginar la gran diversidad de PHAs y RHAs diferentes que pueden generarse mediante la combinación de todos estos procesos. Es importante señalar que los PHAs también pueden ser útiles para aplicaciones biomédicas como biomateriales (Zinn *et al.* 2001. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 53: 5-21). Además, el PHA puede ser considerado como una fuente de RHAs, nuevos compuestos quirales (sintones) de gran utilidad como precursores en la industria farmacéutica, ya que son difíciles de conseguir en estado puro mediante procesos químicos convencionales.

Dentro de los costes de producción de los polihidroxialcanoatos (PHA), el proceso de extracción es probablemente el paso más importante a la hora de reducir costes y resolver el proceso de forma respetuosa con el medio ambiente. Hasta ahora se han desarrollado diferentes métodos para extraer PHA, pero en su mayoría requieren el uso de disolventes orgánicos que son poco respetuosos con el medio ambiente, o cócteles enzimáticos o detergentes, que siendo más respetuosos con el medio ambiente tienen algunos inconvenientes a la hora de escalar el proceso a nivel industrial (Jacquel *et al.* 2008. *Biochem. Eng. J.* 39: 15-27; Elbahloul y Steinbüchel, 2009. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 643-651; Kunasundari y Sudesh, 2011. *Express Polymer Letters* 5: 620-634). Más recientemente se han propuesto métodos de lisis para la extracción del PHA basados en el uso de bacterias modificadas genéticamente que tienen alteradas las propiedades de la superficie celular y que por lo tanto se lisan más fácilmente (Martínez *et al.* 2011. *Microb. Biotechnol.* 4: 533-547; "Sistema de autólisis celular para el procesamiento de la biomasa bacteriana en la producción de polihidroxialcanoatos en *Pseudomonas putida* KT2440"; solicitud de patente PCT/ES2010/070858 Martínez *et al.* publicada como WO 2011/086211 A1). Sin embargo, este método tiene el inconveniente de que al utilizar células parcialmente debilitadas en sus estructuras celulares su manipulación es más delicada y el proceso industrial es más complicado.

Por todo ello, el desarrollo de nuevos métodos o procesos para la producción y extracción de PHAs de forma competitiva y ecológica, se ha convertido en un objetivo fundamental dentro de la biotecnología medioambiental.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

### Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento mediante el cual se puede extraer, de forma competitiva y ecológica, un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en polihidroxialcanoato (PHA), hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, a partir de bacterias productoras presa cultivadas en un medio de producción del bioproducto. La extracción del bioproducto se consigue mediante la acción de una bacteria depredadora que provoca una lisis controlada de la bacteria productora y la liberación del bioproducto al medio extracelular. Preferiblemente, la bacteria productora presa es una bacteria Gram-negativa.

La depredación es un tipo de interacción biológica en la que un individuo (el depredador) se alimenta de otro (la presa) para subsistir. Se trata de un tipo de relación interespecífica, es decir, que se da entre organismos de distintas especies, muy común en la naturaleza, incluyendo también el mundo microbiano. Dentro de este último, la depredación bacteriana es un modo de interacción según el cual un organismo depredador ataca y consume a una bacteria presa.

Las bacterias depredadoras de otras bacterias poseen una amplia distribución en la naturaleza, tanto en hábitats terrestres como acuáticos, incluyendo ambientes extremos o anaerobios. Este tipo de bacterias muestran diferentes fenotipos y adaptaciones metabólicas, pudiendo ser depredadores obligados si son incapaces de replicar en ausencia

de presa, o facultativos si no son dependientes de la presencia de una presa. Además, estas bacterias predadoras utilizan diversas estrategias de predación. Entre éstas se encuentra la predación periplásmica, en la que los predadores invaden el espacio periplásmico de la presa, donde se establecen y degradan el contenido intracelular mientras crecen y se dividen. Esta estrategia de invasión periplásmica es característica del grupo de predadores obligados denominado *Bdellovibrio* y organismos similares denominados en general como BALOs (del inglés *Bdellovibrio and like organisms*), que constituye el grupo de bacterias predadoras mejor estudiado hasta la fecha (Jurkevitch y Davidov, 2007. Phylogenetic diversity and evolution of predatory prokaryotes. In *Jurkevitch, E. (ed.), Predatory Prokaryotes*, vol. IV. Springer-Verlag. 11–56).

Los resultados obtenidos por los investigadores y que sirven de base para esta solicitud de patente son sorprendentes ya que un experto en la materia no esperaría que una bacteria predadora fuera capaz de preda bacterias presa conteniendo en su citoplasma gránulos de bioproducto, es decir, gránulos de PHA, hidrolizado de PHA o una mezcla de ambos.

Adicionalmente, la presente invención también proporciona un método de obtención de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, caracterizado porque comprende:

- a) cultivar la bacteria productora presa en un medio de cultivo en el que se produce el bioproducto,
- b) extraer el bioproducto obtenido en la etapa a) mediante el procedimiento de extracción descrito en el primer aspecto de esta invención, y
- c) aislar el bioproducto.

Durante la etapa a) de fermentación, el bioproducto se acumula en el interior de la bacteria productora en forma de gránulos de PHA. Posteriormente, en la etapa b) estos gránulos son liberados al medio extracelular al lisar la bacteria predadora la pared celular de la bacteria productora presa. En la etapa c) se aísla el bioproducto de los gránulos extraídos. Esta etapa de aislamiento puede comprender uno o más procedimientos de purificación. Adicionalmente, si el bioproducto obtenido en la etapa a) es una mezcla, esta etapa de aislamiento también puede comprender la separación de los diferentes componentes de dicha mezcla.

Adicionalmente, el bioproducto seleccionado del grupo que consiste en polihidroxialcanoato (PHA), hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas obtenido por el método tal como se describe en esta solicitud de patente, puede modificarse químicamente para obtener un derivado de PHA diferente. Esta modificación química puede comprender una o más etapas seleccionadas del grupo que consiste en entrecruzamiento, hidrólisis o adición de uno o más grupos funcionales. Estas etapas adicionales pueden realizarse siguiendo metodologías conocidas por el experto en la materia, por ejemplo, tal como se describen Hazer *et al.*, 2007. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 1-12.

Los resultados obtenidos por los investigadores y que sirven de base para esta solicitud de patente son sorprendentes ya que un experto en la materia esperaría que la bacteria predadora, de ser capaz de preda la bacteria productora presa, consumiera los bioproductos acumulados en el interior de dicha bacteria y, en consecuencia, el rendimiento del método de obtención de PHA, un hidrolizado de PHA o una mezcla de estos sería muy bajo.

#### Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de extracción de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en polihidroxialcanoato (PHA), hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, y obtenido por fermentación de una bacteria productora presa, caracterizado dicho procedimiento de extracción porque comprende mezclar la bacteria productora presa que contiene el bioproducto en su interior con una bacteria predadora en un medio que comprende una fuente de Ca y Mg. Preferiblemente, en un medio que comprende  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$ .

De esta manera, la bacteria predadora origina la ruptura de la envoltura celular de la bacteria productora presa, dando lugar a la liberación de los gránulos del bioproducto acumulados en el citoplasma celular. Así, la presente invención proporciona una solución a la extracción de compuestos producidos por bacterias, en particular a la extracción de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, disminuyendo con ello el uso de productos químicos contaminantes utilizados para lisar las células productoras.

En esta solicitud de patente, se entiende por “hidrolizado de PHA” monómero, dímero, oligómero o mezcla de los anteriores. Este hidrolizado de PHA, también llamado RHA, puede obtenerse por acción de enzimas depolimerasa presentes en las bacterias predadoras y/o en las propias bacterias productoras presa.

La “bacteria productora presa” a la que se hace referencia en esta solicitud de patente es una bacteria productora de uno o varios compuestos de interés, preferiblemente productora de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, que puede ser lisada por la bacteria predadora utilizada en el procedimiento de extracción de la invención.

La "bacteria depredadora" tal como se emplea en la presente invención se refiere a una bacteria capaz de lisar células bacterianas productoras de uno o varios compuestos de interés, preferiblemente productora de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en polihidroxialcanoato (PHA), hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al procedimiento de extracción tal como se describe en esta solicitud de patente, donde la bacteria depredadora es capaz de lisar bacterias presa Gram-negativas. Más preferiblemente, la bacteria depredadora del procedimiento de extracción de la presente invención pertenece al grupo de los BALOs (del inglés *Bdellovibrio and like organisms*). Hasta la fecha se han definido las siguientes especies de BALOs: *Micavibrio* spp (alfa proteobacteria), *Bdellovibrio* spp., *Bacteriovorax* spp. y *Peridibacter* spp. (delta proteobacterias) (Jurkevitch, 2007. *Microbe*, 2: 67–73).

El grupo de los BALOs está formado por bacilos curvados Gram-negativos de pequeño tamaño, aeróbicos y altamente móviles, depredadores obligados de otras bacterias Gram-negativas. Hasta la fecha, las presas empleadas para aislar y caracterizar *Bdellovibrio* pertenecen exclusivamente al filo Proteobacteria, siendo principalmente *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., y *Erwinia* spp. para hábitats terrestres y de agua dulce, y *Vibrio parahaemolyticus* para hábitats marinos (Jurkevitch y Davidov, 2007. Phylogenetic diversity and evolution of predatory prokaryotes. In Jurkevitch, E. (ed.), *Predatory Prokaryotes*, vol. IV. Springer-Verlag. 11–56). Dependiendo de la cepa empleada como presa, la eficiencia de la depredación es diferente; de hecho, se ha determinado que en poblaciones de presas heterogéneas, *Bdellovibrio* infecta unas presas más eficientemente que otras (Rogosky et al. 2006. *Curr. Microbiol.* 52: 81–85).

La mayoría de los BALOs pertenecen a la clase de las delta proteobacterias, dentro del orden *Bdellovibrionales*, el cual comprende dos familias diferentes: *Bdellovibrionaceae* y *Bacteriovoraceae* (Davidov y Jurkevitch, 2004. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1439–1452). Una excepción es un miembro del grupo de los BALOs denominado *Micavibrio* spp., que ha sido clasificado como alfa proteobacteria (Davidov et al. 2006. *Environ. Microbiol.* 8: 2179–2188).

Se conoce el rango de presas de distintos *Bdellovibrios* aislados de suelo y rizosfera, y de la cepa *B. bacteriovorus* 109J (Jurkevitch et al. 2000. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2365–2371).

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al procedimiento de extracción de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, y obtenido por fermentación de una bacteria productora presa, donde dicho procedimiento de extracción comprende mezclar la bacteria productora presa que contiene el bioproducto en su interior con *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 en un medio que comprende una fuente de Ca y Mg.

La clasificación científica de esta bacteria depredadora es: Reino: *Bacteria* / División: *Proteobacteria* / Orden: *Bdellovibrionales* / Familia: *Bdellovibrionaceae* / Género: *Bdellovibrio* / Especie: *bacteriovorus*.

La bacteria *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 es un depredador pequeño que se encuentra en el suelo, que pertenece a las delta proteobacterias y que se alimenta de una amplia gama de otras bacterias Gram-negativas, incluyendo los patógenos humanos (Sockett, 2009. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 523–539). El ciclo de vida de *B. bacteriovorus* es único en el sentido que es bifásico, alternando una fase libre no replicativa de ataque y una fase dependiente de presa con crecimiento intraperiplásmico (Stolp y Starr, 1963. *Antonie Van Leeuwenhoek* 29: 217–248). Durante la fase de crecimiento en el interior del periplasma de la célula hospedadora, *Bdellovibrio* replica su ADN y crece con la presa como fuente de nutrientes, formando el bdelloplasto, célula de la presa redondeada debido a las modificaciones de la pared celular y que contiene el depredador. Cuando los recursos energéticos de la presa se agotan, el *Bdellovibrio* se divide y la progenie se libera para invadir presas frescas lisando la presa (Lambert et al. 2006. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 639–644; Sockett, 2009. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 523–539).

El análisis genómico de *B. bacteriovorus* HD100 ha revelado el complejo repertorio de enzimas hidrolíticas de esta bacteria (Rendulic et al. 2004. *Science* 303: 689–692). *Bdellovibrio* constituye, por tanto, un amplio reservorio de enzimas diferentes y de interés industrial por sus potenciales aplicaciones biotecnológicas (Jurkevitch y Davidov, 2007. Phylogenetic diversity and evolution of predatory prokaryotes. In Jurkevitch, E. (ed.), *Predatory Prokaryotes*, vol. IV. Springer-Verlag. 11–56), entre las que cabe destacar las despolimerasas de PHAs, que hidrolizan el polímero dando lugar a sus derivados RHAs (Martinez, V., et al., 2012. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 6017–6026).

En otra realización preferida, la bacteria productora presa en el procedimiento de extracción del bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, y obtenido por fermentación tal como se describe en esta solicitud de patente, es una bacteria Gram-negativa.

En una realización más preferida, la bacteria productora presa que da lugar a la obtención del bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas tal como se describe en esta invención, es una bacteria Gram-negativa susceptible de ser predada por BALOs, perteneciente

exclusivamente al reino de las *Proteobacteria*, siendo principalmente del género *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Erwinia*, *Vibrio*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Rhodospirillum* o *Wautersia*.

Preferiblemente, esta bacteria Gram-negativa se selecciona del grupo que consiste en *Pseudomonas putida* KT2440 y *Cupriavidus necator* H16.

La clasificación científica de una de las bacterias presa especialmente preferidas de la presente invención es: Reino: *Bacteria* / División: *Proteobacteria* / Orden: *Pseudomonadales* / Familia: *Pseudomonadaceae* / Género: *Pseudomonas* / Especie: *putida*.

La clasificación científica de otra de las bacterias presa especialmente preferidas de la presente invención es: Reino: *Bacteria* / División: *Proteobacteria* / Orden: *Burkholderiales* / Familia: *Burkholderiaceae* / Género: *Cupriavidus* / Especie: *necator*.

En una realización aún más preferida, la presente invención proporciona un procedimiento de extracción de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, y obtenido por fermentación de una bacteria productora presa, donde dicho procedimiento de extracción comprende mezclar la bacteria productora presa que contiene el bioproducto en su interior seleccionada del grupo que consiste en *Pseudomonas putida* KT2440 y *Cupriavidus necator* H16, con *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 en un medio que comprende una fuente de Ca y Mg.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al procedimiento de extracción de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, obtenido por fermentación de una bacteria productora presa tal como se describe en esta solicitud de patente, que comprende la adición de la bacteria predadora a un medio de cultivo que comprende una fuente de Ca y Mg donde se encuentra la bacteria productora presa que contiene el bioproducto en su interior. Preferiblemente, la bacteria predadora pertenece al grupo de los BALOs y la bacteria productora presa es Gram-negativa. Más preferiblemente, la bacteria predadora es *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 y la bacteria productora presa se selecciona del grupo que consiste en *Pseudomonas putida* KT2440 y *Cupriavidus necator* H16.

En una realización más preferida, el medio de cultivo que comprende una fuente de Ca y Mg donde se encuentra la bacteria productora presa que contiene el bioproducto en su interior es un tampón fisiológico que comprende una fuente de Ca y Mg, preferiblemente es HEPES al que se ha adicionado  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$ .

Adicionalmente, la presente invención también se refiere al uso de una bacteria predadora para extraer al menos un compuesto sintetizado por una bacteria presa. Este aspecto adicional de la presente invención se basa en la capacidad de la bacteria predadora para producir la lisis de las células productoras con capacidad de ser predadas, dando lugar a la liberación en el medio extracelular del compuesto sintetizado por las células. En realizaciones preferidas de este aspecto adicional de la presente invención, la bacteria presa y la bacteria predadora se definen tal como se indica en el primer aspecto de esta invención.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método de obtención de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en polihidroxialcanoato (PHA), hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas por fermentación de una bacteria productora presa, caracterizado dicho método de obtención porque comprende:

- a) cultivar la bacteria productora presa en un medio de cultivo para producir el bioproducto,
- b) extraer el bioproducto obtenido en la etapa a) mediante el procedimiento de extracción descrito en el primer aspecto de esta invención, y
- c) aislar el bioproducto.

La etapa c) de aislamiento del bioproducto tal como se describe en esta solicitud de patente puede realizarse mediante una o más técnicas que forman parte del conocimiento general común y, por tanto, están disponibles a un experto en la materia. El aislamiento del bioproducto se puede llevar a cabo por ejemplo, pero sin limitarse, mediante precipitación de dicho producto con fraccionamiento salino, precipitación por calor, precipitación isoeléctrica, con disolventes orgánicos o con polímeros, con acetona fría o mediante cromatografía.

Adicionalmente, el método de obtención del bioproducto tal como se describe en esta solicitud de patente puede comprender una o más etapas de purificación. De ser así, estas pueden tener lugar mediante procedimientos convencionales ampliamente conocidos por el experto en la materia.

Si el bioproducto obtenido en la etapa a) es una mezcla de PHA e hidrolizado de PHA, la etapa c) puede comprender la separación de dicha mezcla para obtener un bioproducto que es uno de los componentes de la mezcla obtenida inicialmente. Estos procedimientos de separación también pueden tener lugar por técnicas que forman parte del conocimiento general común, por ejemplo, por centrifugación.

En una realización preferida, la etapa a) del método de obtención del bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas tal como se describe en esta solicitud de patente, puede comprender cultivar la bacteria productora presa, preferiblemente *Pseudomonas putida* KT2440 o

*Cupriavidus necator* H16, en un medio de cultivo que comprende como fuente de carbono cualquier compuesto susceptible de ser transformado en hidroxialcanoil-CoA mediante el metabolismo bacteriano. Preferiblemente, la fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en glucosa, fructosa y ácido graso procedente de aceite esencial.

5 En otra realización preferida, la presente invención se refiere a un método de obtención de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, donde la etapa a) tiene lugar en un medio mínimo de cultivo.

10 El término "medio mínimo" tal como se emplea en la presente invención se refiere a un medio de cultivo que comprende sales minerales de fósforo, azufre, hierro, magnesio, potasio y nitrógeno, y un compuesto que las bacterias presa puedan utilizar como fuente de carbono.

15 En una realización más preferida, el medio mínimo de cultivo de la etapa a) tal como se describe en esta solicitud de patente comprende  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{SO}_4\text{Fe}$ , siendo especialmente preferible que el medio mínimo de cultivo comprenda 13.6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0.5 mg  $\text{SO}_4\text{Fe} \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  por litro, tamponado a pH 7, medio de cultivo denominado 0.1 N M63, suplementado con 1 mM de  $\text{MgSO}_4$  y una solución de elementos traza (Moldes *et al.*, 2004. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3205–3212).

20 En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al método de obtención tal como se describe en esta solicitud de patente, donde la etapa a) comprende cultivar *Pseudomonas putida* KT2440 en un medio mínimo de cultivo, preferiblemente el medio denominado 0,1 N M63 suplementado con ácido octanoico como única fuente de carbono, para producir una mezcla de PHA e hidrolizado de PHA.

25 En una realización especialmente preferida, la presente invención se refiere a un método de obtención de PHA por fermentación de una bacteria productora presa, donde dicho método comprende:

a) cultivar *Pseudomonas putida* KT2440 en un medio mínimo de cultivo, preferiblemente el medio denominado 0,1 N M63 suplementado con ácido octanoico como única fuente de carbono, para producir una mezcla de PHA e hidrolizado de PHA,

30 b) extraer la mezcla obtenida en la etapa a) mediante el procedimiento de extracción descrito en el primer aspecto de esta invención, preferiblemente añadiendo *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 a una suspensión de células de *Pseudomonas putida* KT2440 cultivadas en la etapa a) en HEPES al que se ha adicionado  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$ , y  
c) aislar PHA.

35 Esta realización preferida la etapa c) comprende el aislamiento de PHA de los gránulos y la separación de la mezcla que comprende PHA e hidrolizado de PHA obtenida en las etapas previas del método de la presente invención. Esta etapa c) puede comprender un procedimiento de centrifugación. Preferiblemente, esta etapa c) de aislamiento comprende: centrifugar el co-cultivo que comprende *Pseudomonas putida* KT2440 lisada y la bacteria depredadora obtenido tras la etapa b), separar el sedimento que comprende mayoritariamente PHA y purificar dicho sedimento por disolución y precipitación en disolventes adecuados. Aún más preferiblemente, en la purificación se utiliza acetato de etilo para disolver el sedimento y metanol para precipitar PHA purificado.

En otra realización especialmente preferida, la presente invención se refiere a un método de obtención de hidrolizado de PHA por fermentación de una bacteria productora presa, donde dicho método comprende:

45 a) cultivar *Pseudomonas putida* KT2440 en un medio mínimo de cultivo, preferiblemente el medio denominado 0,1 N M63 suplementado con ácido octanoico como única fuente de carbono, para producir una mezcla de PHA e hidrolizado de PHA,

b) extraer la mezcla obtenida en la etapa a) mediante el procedimiento de extracción descrito en el primer aspecto de esta invención, preferiblemente añadiendo *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 a una suspensión de células de

50 *Pseudomonas putida* KT2440 cultivadas en la etapa a) en HEPES al que se ha adicionado  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$ , y  
c) aislar el hidrolizado de PHA.

Esta etapa c) de aislamiento comprende la separación y purificación del hidrolizado de PHA extraído en la etapa b). En la literatura se han descrito ampliamente procedimientos de separación y purificación de hidrolizados de PHA. Lo más habitual es separarlos mediante métodos cromatográficos, como por ejemplo HPLC con columnas C18 de fase reversa. (Ruth *et al.*, 2007. *Biomacromolecules*, 8: 279–286).

55 En otra realización preferida, la presente invención se refiere a un método de obtención de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas tal como se describe en esta solicitud de patente, donde la etapa a) tiene lugar en un medio rico de cultivo.

El término "medio rico" tal como se emplea en la presente invención se refiere a un medio que contiene sustancias de composición compleja y poco definida que puedan servir como fuente de nutrientes y energía para el crecimiento del microorganismo.

65

En una realización más preferida, el medio rico de cultivo de la etapa a) del método de obtención del bioproducto tal como se describe en esta solicitud de patente está constituido por un medio nutritivo, conocido como medio nutritivo (NB, Nutrient Broth) (Difco) compuesto de 3 g/l de extracto de carne y 5 g/l de peptona, o el medio Lysogeny Broth (LB) (Sambrook y Russell, 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al método de obtención de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, por fermentación de *Cupriavidus necator*, caracterizado dicho método porque comprende:

- a) cultivar *Cupriavidus necator* en un medio rico de cultivo (NB) suplementado con gluconato sódico para producir el bioproducto,
- b) extraer el bioproducto obtenido en la etapa a) mediante el procedimiento de extracción descrito en el primer aspecto de la presente invención, preferiblemente añadiendo *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 a una suspensión de células de *Cupriavidus necator* cultivadas en la etapa a) en HEPES al que se ha adicionado  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$ , y
- c) aislar el bioproducto.

En una realización especialmente preferida, la etapa c) comprende el aislamiento de PHA o de hidrolizado de PHA. Tal como se ha mencionado anteriormente, esta etapa de aislamiento puede comprender una o más etapas y pueden utilizarse técnicas ampliamente conocidos por el experto en la materia.

En otra realización especialmente preferida, el bioproducto aislado en la etapa c) es polihidroxibutirato (PHB).

Adicionalmente, el bioproducto seleccionado del grupo que consiste en polihidroxialcanoato (PHA), hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas obtenido por el método tal como se describe en esta solicitud de patente, puede modificarse químicamente para obtener un derivado de PHA diferente. Esta modificación química puede ser hidrólisis de PHA para obtener RHA, entrecruzamiento o funcionalización de PHA para obtener un biopolímero con propiedades diferentes al PHA obtenido por fermentación como las detalladas en Hazer et al., 2007. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74: 1-12: copolimerización o funcionalización de cadena lateral basadas en esterificación, entrecruzamiento, cloración, epoxidación etc.

El PHA obtenido por el método tal como se describe en esta solicitud de patente, se puede utilizar en la fabricación de un material de envasado tal como, por ejemplo, una película. Dicho material de envasado puede utilizarse, entre otras, en la industria alimentaria o farmacéutica.

Adicionalmente, el PHA obtenido por el método de obtención tal como se describe en esta solicitud de patente también se puede hidrolizar para obtener 3-hidroxiácido (RHA), compuesto que puede utilizarse como precursor en la síntesis de productos farmacéuticos. Los monómeros y oligómeros de PHA son importantes componentes con considerables aplicaciones biotecnológicas. Se ha demostrado que algunos RHAs son compuestos con actividad antimicrobiana, insecticida, antiviral, e incluso se han descrito RHAs como agentes antitumorales como la *hapalosina* y el *ONO-4007* (de Roo et al., 2002. Biotechnol. Bioeng., 77: 717-722). Los RHAs son sintones para la fabricación de vitaminas, aromatizantes, antibióticos y feromonas. Así, por ejemplo, el (R)-3-hidroxibutirato se utiliza para la síntesis de *Tienamicina* y *Captopril* (Ohashi y Hasegawa, 1992. In: Sheldrake G. N., A. N. Collins, J. Crosby, editors. Chirality in industry. New York: John Wiley & Sons. 1992, p. 269-278) y el (R)-4-ciano-3-hidroxibutirato es un intermediario muy importante en la fabricación del *Lipitor*, uno de los medicamentos de elección para el control de los niveles de colesterol (Roth, 2002. Prog. Med. Chem., 40: 1-22). Ejemplos de otros compuestos sintetizables a partir de RHAs son el precursor de L-659,699 que es un inhibidor de la síntesis de colesterol, depsipeptidos con actividad antimicrobiana o fungicida, (-)-tetrahidrolipstatina, una droga para el tratamiento de la obesidad, inmunosupresores como las estevastelins B y B3, el antibiótico globomicina, y pravastatina, para el tratamiento de la hipercolesterolemia (revisado en Ren et al. 2010. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87:41-52).

## EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos ilustrativos y de carácter no limitante, realizados por los inventores que describen el uso de las cepas de la invención para la extracción de cualquier compuesto sintetizado por la cepa de *Pseudomonas putida* KT2442, y *Cupriavidus necator* H16.

### EJEMPLO 1. Materiales y métodos

#### 1.1. Descripción de los microorganismos empleados.

Las cepas utilizadas se detallan en la Tabla 1.



**Tabla 1.** Cepas empleadas.

<b>Cepa</b>	<b>Genotipo/fenotipo relevante</b>	<b>Referencia</b>
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	<i>Pseudomonas putida</i> mt-2 curada del plásmido TOL, <i>hsdR</i>	ATCC47054
<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> HD100	Cepa tipo, genoma secuenciado	ATCC15356
<i>Cupriavidus necator</i> H16	PHB+	ATCC17699

**1.2. Medios y condiciones de cultivo empleados.**

El medio rico utilizado para cultivar las células fue el medio nutritivo (NB, Nutrient Broth) (Difco) o el medio Lysogeny Broth (LB) (Sambrook y Russell, 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

El medio mínimo utilizado para cultivar las células fue el medio denominado 0,1 N M63 (13,6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,5 mg  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  por litro, pH 7) suplementado con 1 mM de  $\text{MgSO}_4$  y una solución de elementos traza (Moldes *et al.*, 2004. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3205–3212).

Los cultivos en medio líquido se realizaron en matraces en un agitador orbital (New brunswick scientific) con agitación (200-250 rpm) y 30°C.

La bacteria *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 fue rutinariamente crecida en co-cultivos en tampón HEPES (25 mM de HEPES modificado con 2 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 3 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,8) con *P. putida* KT2440 crecida en NB como presa durante 48 h a 30 °C y 250 rpm.

El crecimiento en medio líquido se determinó por turbidimetría a 600 nm ( $\text{DO}_{600}$ ) empleando un espectrofotómetro Beckman DU-520.

Durante periodos inferiores a un mes las cepas se conservaron a 4°C en placas de LB. Para la conservación a largo plazo, las bacterias se congelaron en el medio de cultivo correspondiente con glicerol al 15% (v/v) y se mantuvieron a -80°C.

Para producir PHA en *Pseudomonas putida* KT2440 se cultivaron las células durante 24 h en medio M63 0,1 N cuya composición es similar a la del M63 pero con 0,2 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en lugar de 2 g/l, utilizando 15 mM de octanoato como única fuente de carbono (Moldes *et al.* 2004. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3205–3212).

Para producir PHB en *Cupriavidus necator* H16 se cultivaron las células durante 24 h a 30°C en medio NB suplementado con gluconato sódico 0,2% (Pfeiffer *et al.* 2011. *Molec. Microbiol.* 82: 936–951).

**1.3. Cálculo de la viabilidad de los microorganismos.**

Para calcular la viabilidad de la bacteria predadora se hicieron diluciones seriadas de los cultivos de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  en caldo nutritivo diluido que consiste en 0,8 g/l de NB suplementado con 2 mM  $\text{CaCl}_2$  y 3 mM  $\text{MgCl}_2$ . A continuación 0,1 ml de la dilución apropiada de células se mezcló con 0,5 ml de bacteria presa *P. putida* KT2440 preparada para ser predada. Para ello la bacteria presa se precultivó en NB, se centrifugo y se resuspendió el sedimento celular en tampón HEPES a 10 de  $\text{DO}_{600}$ . La mezclas de las distintas diluciones se agitaron y se sembraron en medio sólido DNB mediante el método de superposición de dos capas (Lambert *et al.* 2003. *Environ. Microbiol.* 5: 127–132). Los predadores se cuentan como unidades formadoras de placas (ufp) en desarrollo en el césped de *P. putida* KT2440 después de 48 h de incubación a 30 °C.

Para llevar a cabo este procedimiento se pueden utilizar en lugar de HEPES otro medio o tampón fisiológico como por ejemplo medio NB diluido 10 veces (DNB).

Para calcular la viabilidad de las cepas presa, 10  $\mu\text{l}$  de cada dilución del cultivo se plaquéó en medio LB sólido y se contaron las unidades formadoras de colonias (ufc).

**1.4. Cálculo de biomasa.**

Las densidades celulares, expresadas en gramos de peso de célula seca (CDW) por litro, se determinaron gravimétricamente utilizando tubos Falcon tarados de 50 ml. Treinta mililitros de medio de cultivo se centrifugaron durante 45 min a 3800 x g y 4 °C. Los sedimentos celulares se liofilizaron durante 24 h en un liofilizador y se pesaron.

### 1.5. Crecimiento de *B. bacteriovorus* HD100 sobre cepas presa acumulando PHA.

30 ml de las cepas presa crecidas en medio de producción de PHA, se centrifugaron y se resuspendieron en 30 ml de tampón HEPES, siendo la viabilidad de  $3 \cdot 10^8$  ufc/ml. Posteriormente, se infectaron con  $3 \cdot 10^7$  ufp/ml de *B. bacteriovorus* HD100. Los co-cultivos se desarrollaron en matraces de 250 ml en un volumen final de 30 ml con tampón HEPES.

### 1.6. Recuperación del PHA liberado al medio extracelular.

Con el objetivo de purificar el PHA liberado al medio de cultivo se centrifugaron 30 ml de co-cultivo de *B. bacteriovorus* HD100 predando sobre *P. putida* KT2440 durante 24 horas, y el sedimento resultante se resuspendió directamente en 1 ml del solvente orgánico etil-acetato. Después de la incubación con el solvente orgánico a temperatura ambiente y con agitación suave, se centrifugó y se precipitó el sobrenadante con 10 volúmenes de metanol. Tras la evaporación del alcohol, se cuantificó el contenido de PHA extraído.

### 1.7. Cuantificación de PHA.

Para cuantificar el PHA presente en los sedimentos celulares se tomaron de 5 a 10 mg de muestra liofilizada que se metanolizaron durante 4 h a 100°C en presencia de 2 ml de cloroformo y 2 ml de metanol: ácido sulfúrico (85:15, v:v) con 0,5 mg/ml de ácido metil benzoico como estándar interno. Tras enfriar los tubos, se añadió 1 ml de agua, se mezcló por agitación vigorosa (vórtex) y se separaron las fases centrifugando suavemente. La fase orgánica obtenida se analizó en un sistema cromatográfico compuesto por un cromatógrafo de gases Agilent (Waldbronn, Alemania) serie 7890 A acoplado a un detector de masas 5975. 1 µl de la fase orgánica fue inyectada en el cromatógrafo con un *split* 50:1. La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna capilar HP5 MS (5% fenil-95% metil siloxano, 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 mm). Como gas portador se utilizó helio a un flujo de 0,9 ml/min. Las temperaturas del inyector y la línea de transferencia fueron de 275 y 300°C, respectivamente. El programa de temperatura de la columna fue el siguiente: temperatura inicial 80°C durante 2 min tras lo cual se aplicó una rampa de 10°C/min hasta alcanzar los 200°C. El espectro de masas se recogió en modo *full scan* (m/z 40-550). El análisis cuantitativo se llevó a cabo calculando los factores de respuesta de los monómeros con respecto al estándar interno 3-metilbenzoato. Para el cálculo de los factores se utilizaron mezclas de concentraciones conocidas de PHA, obteniéndose para cada uno de los monómeros cuantificados un factor de respuesta cuyo coeficiente de variación no superó el 5%.

### EJEMPLO 2. Producción de PHA en *Pseudomonas putida* KT2440.

Para estudiar la producción de PHA en la cepa de *Pseudomonas putida* KT2440 se cultivó la bacteria en una sola fase fermentativa en un medio mínimo según se describe en el Ejemplo 1.

El crecimiento en condiciones de producción de plástico en una sola fase fermentativa permite crecer a partir de una única fuente de carbono (ácido octanoico) y alcanzar un alto rendimiento biomasa/PHA.

Se comprobó la capacidad de *P. putida* KT2440 para crecer y producir PHA en un medio mínimo limitado en nitrógeno, con ácido octanoico como única fuente de carbono. La cepa es capaz de crecer y acumular PHA en esas condiciones fermentativas (Tabla 2). Este resultado fue confirmado mediante la cuantificación por GC-MS del contenido intracelular de PHA. Esto demostró que la cepa acumula PHA en las condiciones de crecimiento probadas (Tabla 2).

Tabla 2. Muestra el valor de densidad óptica (DO<sub>600</sub> nm); el contenido intracelular de PHA; el recuento de células viables (ufc/ml) y la biomasa (g/l) correspondientes a células crecidas en una fase fermentativa a las 23 h de cultivo de la cepa *Pseudomonas putida* KT2440.

	<i>P. putida</i> KT2440
DO <sub>600</sub>	7 ± 0.5
Contenido intracelular de PHA (g/l)	0.84 ± 0.1
Biomasa (g/l)	1.3 ± 0.11
Viabilidad (ufc/ml)	3·10 <sup>8</sup> ufc/ml

**EJEMPLO 3. Lisis de *P. putida* KT2440 mediada por *B. bacteriovorus* HD100**

El sistema lítico del presente ejemplo consiste en el crecimiento de *B. bacteriovorus* HD100 sobre *P. putida* KT2440 previamente crecida en las condiciones de producción de PHA descritas en el Ejemplo 2.

A lo largo de la incubación del co-cultivo se observa el crecimiento de la bacteria depredadora provocando la lisis celular de la bacteria presa. A las 24 h de infección, la viabilidad de la presa disminuye 4 órdenes de magnitud (de  $3 \cdot 10^8$  a  $4 \cdot 10^4$  ufc/ml) mientras que la progenie de *B. bacteriovorus* HD100 aumenta más de dos órdenes de magnitud (de  $3 \cdot 10^7$  a  $1.5 \cdot 10^9$  ufp/ml) (Tabla 3).

La cuantificación del PHA liberado al medio extracelular como consecuencia de la lisis de *P. putida* KT2440 tras 24 h de infección resultó ser similar al contenido de PHA al inicio de la infección con el depredador (0,45 g/l y 0,84 g/l, respectivamente), es decir, un 50 % del PHA acumulado por la presa (Tabla 3).

A las 24 h de cocultivo también se liberan  $0.2 \pm 0.02$  g/l de RHAs: monómeros, dímeros y trímeros (Tabla 3).

Con el objetivo de purificar el PHA liberado al medio de cultivo se centrifugaron 30 ml del co-cultivo de *B. bacteriovorus* HD100 sobre *P. putida* KT2440 y se resuspendieron directamente en etil-acetato. Tras la precipitación del polímero con metanol, se cuantificó el contenido de PHA extraído, siendo de 0.4 g/l con una pureza del 99%. Este resultado indica que el proceso aquí descrito permite la recuperación de casi el 100% del PHA previamente liberado al sobrenadante del cultivo, lo que corresponde a un 50% del PHA producido por *P. putida* KT2440.

TABLA 3.

Cultivos	Biomasa 0 h (g l <sup>-1</sup> )	Contenido PHA 0 h (g l <sup>-1</sup> )	Contenido PHA en el sedimento 24 h (g l <sup>-1</sup> )	Productos de hidrólisis del PHA en el sobrenadante 24 h (g l <sup>-1</sup> ) (RHAs)	Viabilidad de la presa 24 h (10 <sup>8</sup> cfu ml <sup>-1</sup> )	Viabilidad de <i>Bdellovibrio</i> 24 h (10 <sup>8</sup> pfu ml <sup>-1</sup> )
<i>Pseudomonas putida</i>						
KT2442 (Bd) <sup>a</sup>	1.33 ± 0.11	0.84 ± 0.1	0.75 ± 0.0	< 0.05	3.6 ± 1.5	0
KT2442 + Bd	1.33 ± 0.11	0.84 ± 0.1	0.45 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.2 ± 0.03	0.001 ± 0.0	15.4 ± 3

<sup>a</sup> Cultivos control de las presas sin depredador

A tiempo cero, la viabilidad de las presas es de  $3 \cdot 10^8$  ufc/ml

Los RHAs se purificaron según un método descrito anteriormente (Ruth *et al.*, 2007. *Biomacromolecules*, 8: 279–286). Brevemente, los RHAs se pueden separar mediante una columna cromatográfica de C18 de fase reversa y las fracciones resultantes se acidifican, se realizan extracciones líquido-líquido y se evapora el solvente, obteniendo así el RHA puro. El rendimiento de este método es superior al 75%.

**EJEMPLO 4. Producción de PHB en *Cupriavidus necator* H16**

Para estudiar la producción de PHB en la cepa de *Cupriavidus necator* H16 se cultivó la bacteria en una sola fase fermentativa en un medio rico según se describe en el Ejemplo 1. La cepa es capaz de crecer y acumular 0.9 g/l PHB en esas condiciones fermentativas.

**EJEMPLO 5. Lisis de *Cupriavidus necator* H16 mediada por *B. bacteriovorus* HD100**

El sistema lítico del presente ejemplo consiste en el crecimiento de *B. bacteriovorus* HD100 sobre *C. necator* H16 crecida en condiciones de producción de PHB (ver Ejemplo 4).

La cuantificación del PHB liberado al medio extracelular como consecuencia de la lisis de *C. necator* H16 tras 24 h de infección con el depredador resultó ser igual o superior al 50% del total del PHB previamente acumulado por la presa (0.5 y 0.9 g/l PHB, respectivamente).

Con el objetivo de purificar el PHB liberado al medio de cultivo se centrifugaron 30 ml del co-cultivo de *B. bacteriovorus* HD100 sobre *C. necator* H16 y se resuspendieron directamente en 1 ml de cloroformo. Tras la precipitación del polímero con metanol, se cuantificó el contenido de PHB extraído, siendo de 0.15 g/l con una pureza del 99%.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de extracción de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en polihidroxialcanoato (PHA), hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, y obtenido por fermentación de una bacteria productora presa, caracterizado dicho procedimiento de extracción porque comprende mezclar la bacteria productora presa que contiene el bioproducto en su interior con una bacteria predadora en un medio que comprende una fuente de Ca y Mg.
2. Procedimiento de extracción según la reivindicación anterior, donde la bacteria predadora pertenece al grupo de los BALOs.
3. Procedimiento de extracción según la reivindicación 2, donde la bacteria predadora es *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100.
4. Procedimiento de extracción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la bacteria productora presa es una bacteria Gram-negativa.
5. Procedimiento de extracción según la reivindicación 4, donde la bacteria Gram-negativa es *Pseudomonas putida* KT2440.
6. Procedimiento de extracción según la reivindicación 4, donde la bacteria Gram-negativa es *Cupriavidus necator* H16.
7. Procedimiento de extracción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende adicionar la bacteria predadora a un medio de cultivo que comprende una fuente de Ca y Mg donde se encuentra la bacteria productora presa que contiene el bioproducto en su interior.
8. Método de obtención de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en polihidroxialcanoato (PHA), hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas por fermentación de una bacteria productora presa, caracterizado dicho método porque comprende:
  - a) cultivar la bacteria productora presa en un medio de cultivo para producir el bioproducto,
  - b) extraer el bioproducto obtenido en la etapa a) mediante el procedimiento de extracción descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y
  - c) aislar el bioproducto.
9. Método de obtención según la reivindicación 8, donde la etapa a) comprende cultivar *Pseudomonas putida* KT2440 en un medio mínimo de cultivo para producir una mezcla de PHA e hidrolizado de PHA.
10. Método de obtención según una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, donde la etapa c) comprende aislar PHA.
11. Método de obtención según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, donde la etapa c) comprende aislar el hidrolizado de PHA.
12. Método de obtención según la reivindicación 8, donde el bioproducto se selecciona del grupo que consiste en polihidroxialcanoato (PHA), hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, y el método comprende:
  - a) cultivar la bacteria productora presa en un medio rico de cultivo en el que se produce el bioproducto,
  - b) extraer el bioproducto obtenido en la etapa a) mediante el procedimiento de extracción descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y
  - c) aislar el bioproducto.
13. Método de obtención según la reivindicación 12, donde la etapa a) comprende cultivar *Cupriavidus necator* en un medio rico de cultivo (NB) suplementado con gluconato sódico para producir una mezcla de PHA e hidrolizado de PHA.
14. Método de obtención según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, donde la etapa c) comprende aislar PHA o el hidrolizado de PHA.